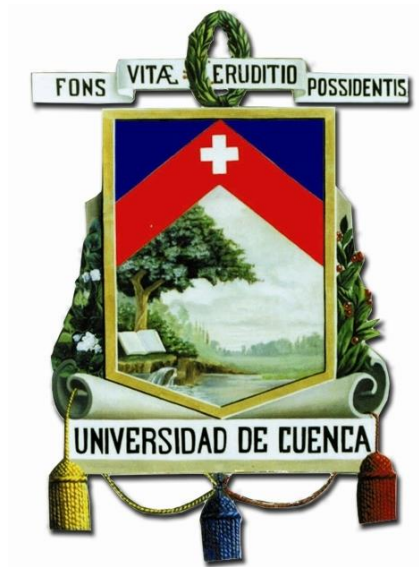


# UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL.**

**“Evaluación pre y post congelación del semen  
obtenido con vagina artificial y electroeyaculador  
en el ganado criollo”**

*Tesis de grado previo a la  
obtención del título de Magister  
en Reproducción Animal.*

**AUTOR: MVZ. Javier Esteban Mejía Gutiérrez.**

**DIRECTOR: Dr. Manuel Soria Parra. Mg.Sc.**

**CUENCA - ECUADOR  
2017**

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad y la congelabilidad del semen obtenido mediante Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculador (EE) en ganado biotipo criollo. El material seminal fue colectado de tres toros biotipo criollo, utilizando VA modelo IMV (VA T1=30) y Electroeyaculador electrónico portátil marca Standard Precisión Electronics®, que tras realizar el masaje tras-rectal para facilitar la excitación del animal, se introdujo el dispositivo que presenta un ciclo que va de 0 MA dejando entre ellas pausas de 2 segundos de descanso y se van elevando gradualmente hasta 150 MA promedio hasta conseguir la erección y posterior eyaculación (EE T2=30). Se procesó con diluyente AndroMed® ajustando a dosis inseminante de  $20 \times 10^6$  y se sometió a un tiempo de equilibrio de 2 horas a 5°C. Se empajueló en pajillas de 0,25 ml y se sometió a vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos y luego dejándolas caer para lograr una temperatura de -196°C. A los 30 días se descongeló para evaluar mediante microscopia óptica, calidad seminal Motilidad Masal (MM), Motilidad Individual Progresiva (MIP), Vitalidad Espermática (VE), Anormalidades, test de HOST y mediante el sistema CASA se evaluó motilidad total (TM), progresiva (IPM), local (LM) y espermatozoides inmóviles (IS). Se usó un diseño completamente al azar (DCA) y los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS *versión 22.0*, posteriormente fueron sometidos a análisis donde la Media y Error estándar de las variables de calidad espermática precongelación comprobó la existencia de diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) en Concentración, MM, MIP y AT, atribuyendo eficacia al método de VA y las variables de calidad espermática post-congelación evidenció la existencia de diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) en AC y test de HOST, en la cual demuestra garantía en la utilización del método con VA. Con el sistema CASA no se encontró diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) entre métodos de colecta en ningún parámetro. En conclusión, la utilización de vagina artificial como método de colecta de semen de bovino biotipo criollo obtenido por VA presenta mejores parámetros de calidad pre y post congelación que el semen que es colectado con electro EE.

**Palabras Clave:** Semen de toro, Vagina Artificial, Electroeyaculador.



## **ABSTRACT**

The objective of this research was to evaluate the quality and the freezing of semen obtained by Artificial Vagina (VA) and Electroeyaculator (EE) in creole biotype cattle. The seminal material was collected from three biotype creole bulls, using VA model IMV (VA T1 = 30) and Portable electronic Electroeyaculador brand Precision Electronics®, which after performing the rectal massage to facilitate the excitation of the animal, the device was introduced which presents a cycle which goes from 0 MA leaving between pauses of 2 seconds of rest and gradually rising to 150 MA rising to achieve erection and subsequent ejaculation (EE T2 = 30). It was processed with AndroMed® diluent adjusting at an inseminating dose of  $20 \times 10^6$  and subjected to an equilibrium time of 2 hours at 5 ° C. It was soaked in 0.25 ml straws and subjected to liquid nitrogen vapors for 10 minutes and then dropped to a temperature of -196°C. At 30 days, it was thawed to evaluate by electronic microscopy, seminal quality Motile Mass (MM), Progressive Individual Motility (MIP), Sperm Vitality (VE), Abnormalities, HOST test and by CASA system, quality total motile (TM), progressive (MPI), local (LM) and immotile spermatozoa (IS). A completely randomized design (DCA) was used and the results were analyzed with the statistical program SPSS version 22.0, later they were subjected to analysis where the mean and standard error of the variables of sperm quality pre-freezing verified the existence of statistical differences ( $P < 0.05$ ) in Concentration, MM, MIP and AT, attributing efficacy to the VA method and post-freezing sperm quality variables evidenced the existence of statistical differences ( $P < 0.05$ ) in CA and HOST test, in the Which demonstrates the efficacy of the VA method. With the CASA system no statistical differences ( $P < 0.05$ ) were found between collection methods in any parameter. In conclusion, the use of artificial vagina as a method of collecting semen from bovine biotype creole obtained by VA presents better pre and post freeze quality parameters than the semen that is collected with electro EE.

Palabras Clave: Bull semen, Artificial Vagina, Electroeyaculator.



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
TABLA DE CONTENIDO .....	4
LISTA DE TABLAS .....	6
LISTA DE ANEXOS .....	7
CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR .....	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....	9
AGRADECIMIENTOS .....	10
DEDICATORIA .....	11
CAPITULO I: INTRODUCCION .....	12
Objetivo general .....	13
Objetivo específico .....	13
Hipótesis: .....	13
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1. Bovino biotipo criollo. ....	14
2.2. La inseminación artificial. ....	14
2.3. Colección de semen bovino. ....	15
2.3.1. Vagina Artificial. ....	15
2.3.2. Masaje tras-rectal. ....	15
2.3.3. Electroeyaculación. ....	16
2.4. Tecnicas de evaluacion de semen fresco. ....	17
2.4.1. Pruebas macroscópicas. ....	17
2.4.2. Pruebas Microscópicas.....	18
2.4.3. Procesamiento de semen.....	20
2.4.4. Criopreservación.....	21
2.4.5. Crioprotectores.....	21
2.4.6. Congelación.....	22
2.4.7. Descongelación. ....	22
2.4.8. Evaluación del semen post - congelación. ....	23
2.4.9. Prueba hipoosmótica en espermatozoides. ....	23
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS. ....	24
3.1. Materiales. ....	24
3.1.1. Materiales biológicos.....	24



3.1.2. Materiales de campo.....	24
3.1.3. Equipos e instrumentos de laboratorio. ....	24
3.1.4. Reactivos. ....	24
3.2. Caracterización de la unidad de análisis. ....	24
3.3. Lugar de la Investigación. ....	25
3.4. Reproductores. ....	25
3.5. Metodología de trabajo. ....	25
3.5.1. Preparación de los toros donantes .....	25
3.5.2. Excitación pre-coital. ....	25
3.5.3. Colección del semen.....	26
3.5.4. Evaluación de semen fresco.....	26
3.5.5. Procesamiento del semen.....	28
3.5.6. Dilución de semen. ....	29
3.5.7. Preparación de las pajuelas. ....	29
3.5.8. Envasado del semen.....	29
3.5.9. Tiempo de equilibrio. ....	29
3.5.10. Crioconservación del semen. ....	29
3.5.11. Descongelamiento.....	29
3.5.12. Evaluación del semen descongelado. ....	30
3.6. Diseño experimental y estadístico. ....	31
Tabla 1. Operacionalización de las variables .....	32
CAPITULO IV: RESULTADOS .....	33
4.1. Evaluación pre congelación. ....	33
4.2. Evaluación post-congelación.....	34
4.2.1. Variables evaluadas por microscopía óptica. ....	34
4.2.2. Variables determinadas por sistema CASA. ....	35
CAPITULO V: DISCUSIÓN .....	36
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	39
RECOMENDACIONES .....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	40
ANEXOS.....	45



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de las variables.....	36
<b>Tabla 2.</b> Media y Error estándar de las variables de calidad espermática pre congelación.....	37
<b>Tabla 3.</b> Media y Error estándar de las variables de calidad espermática post congelación.....	38
<b>Tabla 4.</b> Media y error estándar de las variables de calidad espermática post-congelación evaluadas mediante el sistema CASA.....	39



## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Prueba de Normalidad de datos de Shapiro Wilk para variables espermáticas Pre congelación.
- Anexo 2.** Prueba de Homogeneidad de las varianzas de Levene para variables espermáticas Pre congelación.
- Anexo 3.** ANOVA de Variables de calidad espermática precongelación.
- Anexo 4.** Prueba U de Mann Withney para Motilidad Masal Precongelación.
- Anexo 5.** Prueba de Normalidad de datos de Shapiro Wilk para variables espermáticas post - descongelación.
- Anexo 6.** Prueba de Homogeneidad de las varianzas de Levene para variables espermáticas Pos descongelación.
- Anexo 7.** ANOVA de variables de calidad espermática post - descongelación.
- Anexo 8.** Prueba U de Mann Withney para AT y HOS-Test post - descongelación.
- Anexo 9.** Fotografías.

## CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

**JAVIER ESTEBAN MEJIA GUTIERREZ**, autor de la tesis “**EVALUACIÓN PRE Y POST CONGELACIÓN DEL SEMEN OBTENIDO CON VAGINA ARTIFICIAL Y ELECTROEYACULADOR EN EL GANADO CRIOLLO**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MAGISTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor/a

Cuenca, 12 de Febrero del 2017

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del autor, sobre un fondo blanco.

Javier Esteban Mejía Gutiérrez  
C.I. 0103907663





## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

**JAVIER ESTEBAN MEJIA GUTIERREZ**, autor de la tesis “**EVALUACIÓN PRE Y POST CONGELACIÓN DEL SEMEN OBTENIDO CON VAGINA ARTIFICIAL Y ELECTROEYACULADOR EN EL GANADO CRIOLLO**”,  
certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de Febrero del 2017

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la de Javier Esteban Mejía Gutiérrez, escrita sobre un fondo blanco.

Javier Esteban Mejía Gutiérrez  
C.I. 0103907663



## **AGRADECIMIENTOS**

Un gran agradecimiento a mi director Dr. Manuel Soria, por brindar su capacidad y conocimientos que aportaron al aprendizaje y formación académica de mi persona.

De la misma manera, quiero agradecer muy especialmente al MAGAP – Dirección Provincial Agropecuaria del Azuay, con su representante Ing. Xavier Serrano Salgado, quien brindó todo su apoyo y confianza para emprender este nuevo reto de estudio y de igual manera a cada uno de mis compañeros de la institución.

A los docentes el Dr. Ricardo Alverio, Dr. Andrés Galarza, Dr. Daniel Argudo, Dr. Ulises Iñiguez y el Ing. Patricio Bueno quienes conformaron el equipo de investigación y laboratorio de Biotecnología y al personal administrativo de la Universidad de Cuenca – Facultad de Ciencias Agropecuarias – Carrera de Medicina Veterinaria y Zootécnica un agradecimiento eterno.

A mi familia que siempre me brindó su apoyo incondicional



## **DEDICATORIA**

A Dios, a mi esposa Mónica Malla, a mis hijas Alejandra, Emilia y Gabriela quienes son mi mayor fuente de inspiración y mi apoyo incondicional



## **CAPITULO I: INTRODUCCION**

La inseminación artificial es un proceso mediante el cual los espermatozoides obtenidos del macho son procesados, almacenados y artificialmente introducidos en el tracto reproductor de la hembra con el propósito de lograr una preñez. La técnica de inseminación artificial se ha convertido en una de los procesos más importantes que se ideó para el mejoramiento hereditario de los animales de granja logrando grandes objetivos y el progreso del ganado lechero que ha hecho obtener animales de gran valor genético (Garner & Seidel, 2008).

El mejoramiento genético de los animales de granja se ha favorecido significativamente por el uso de la inseminación artificial, a su vez con el tiempo se ha logrado la mejora de la técnica de inseminación artificial lo que ha permitido en la actualidad implementar nuevas alternativas productivas, como transferencia de embriones y otras biotécnicas reproductivas. Sin embargo el problema que se tiene con el uso de esta práctica es la calidad del semen relacionada con la capacidad reproductiva del toro, manejo del material seminal y los métodos de criopreservación (Januškauskas & Žilinskas, 2002).

Es importante tener en cuenta que para el proceso de congelación de esperma es necesaria la implementación de un banco de células de esperma, que se utilizará para la inseminación artificial, una herramienta importante para la distribución del potencial genético de los machos bovinos (Amirat et al., 2004).

El primer paso en la creación del banco de semen criopreservado biotipo criollo, es el uso de un adecuado método de recolección del semen. Marco-Jiménez, et al. (2005). La colección de material seminal bovino para su prosesamineto se efectúa básicamente por dos métodos, la vagina artificial y el electroeyaculador. Ake-Lopez et al. (1997). La colección del esperma con vagina artificial se asemeja al servicio natural, pero por lo general requiere un periodo de preparación preliminar, mientras que para la obtención de semen de un gran número de toros, la electroeyaculación es el método más utilizado, es por eso que se debe tomar en cuenta el método de recolecta ya que se puede ver afectados algunos parámetros como la calidad espermática, así como la viabilidad de los espermatozoides llegando a deteriorarse como consecuencia de la congelación y descongelación (Foote, 2002).

La Vagina artificial como método de colección permite obtener los mejores y más representativos eyaculados, pero no siempre es posible utilizarlo debido a que no todos los toros responden apropiadamente ya sea por falta de costumbre o no están entrenados. Es importante indicar que en toros con una buena preparación sexual y entrenamiento al usar la vagina artificial como método de recolección puede incrementar la calidad del material seminal (Hernández et al., 1964).



La otra técnica usada es el electroeyaculador, que tiene como característica, incrementar el volumen seminal, pero a su vez la concentración espermática es reducida, lo cual genera dificultades en el proceso, ocasionando que este tipo de eyaculados no resistan apropiadamente a la congelación (Barth et al., 2004).

El objetivo principal de la presente investigación intenta definir la mejor estrategia para implementar un tipo de biotécnica reproductiva que permita la preservación de esta raza, para lo cual se planteó la investigación buscando la mejor opción que permita dar buenos resultados. Los problemas detectados están entonces relacionados con la definición de las estrategias de elección en la biotécnica reproductiva para la conservación de material genético de interés.

Es por eso que me he planteado los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

- Evaluar la calidad y congelabilidad del semen obtenido mediante vagina artificial y electroeyaculador en ganado biotipo criollo.

### **Objetivo específico**

- Comparar las características seminales pre y post congelación del semen como MIP, VE, Anormalidades morfológicas y test de HOST obtenido mediante las dos técnicas de extracción de semen.

**Hipótesis:** La conservación de material seminal de bovino biotipo criollo obtenido por vagina artificial presenta mejores parámetros de calidad pre y post congelación que el semen que es colectado con electro eyaculador.



## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Bovino biotipo criollo.

En el Ecuador existen zonas andinas que poseen un rango de altitud entre los 1500 a 3000 metros de altura. En este medio hay una producción escasa forrajera, compuesta por pastizales naturales. Los bovinos criollos identificados en este sector son animales adaptados a este medio, por lo que se sabe que los malos manejos que se realizan hace que su capacidad productiva y reproductiva no sea significativa, pero a su vez este tipo de raza muestra cualidades como es el elevado instinto materno, rusticidad y alta capacidad para aprovechar el poco alimento que existe en la zona, lo cual hace de que requiera una menor demanda en la tecnificación para el manejo y crianza. Es importante señalar las características del bovino criollo como es de ser un animal de naturaleza manso, pequeño, largo, que posee bajo peso debido al ambiente en que habita, por sus medidas e índices zoométricos, se lo define como un típico animal doble propósito, lo que sumado a la funcionalidad que le dan en la zona como arador, lo convierten en un "triple propósito" (Aguirre et al., 2011).

Es un animal con un libido y calidad seminal que va en aumento con la edad, el semen de esta raza criolla presenta excelentes valores de calidad seminal, posee una tenue baja de concentración espermática en comparación a otras razas, se reemplaza con un mayor volumen y motilidad masal e individual, logrando obtener un mayor número de dosis por eyaculado en procesos de criopreservación (Aguirre et al., 2011).

### 2.2. La inseminación artificial.

La inseminación artificial es la técnica más importante ideada para la mejora genética de los animales. Las principales ventajas de la IA son: mejoramiento genético; control de las enfermedades venéreas; disponibilidad de registros de servicios exactos; servicio económico; y la seguridad a través de la eliminación de los machos peligrosos (Huanca, 2001). La inseminación artificial en bovinos es una biotecnología reproductiva que aumenta el manejo de los toros genéticamente superiores y aumenta las posibilidades de su expansión a gran escala (Gibbons, 2002).



### **2.3. Colección de semen bovino.**

Celeghini et al., (2008), manifiesta que en la realización de experimentos en la inseminación artificial a menudo es necesario utilizar un método de recogida de semen. Los métodos utilizados son; colección con la vagina artificial, masaje trans-rectal y el uso de la estimulación eléctrica por vía rectal. Con la necesidad de utilizar el método más adecuado, es importante saber si estos afectan la calidad semen de manera diferente, por lo tanto, es importante comparar la calidad del material seminal y los resultados de la inseminación artificial con el semen obtenido por cada uno de los tres métodos (Aguirre Flores, 2005).

Es importante recalcar que mediante la metodología propuesta el 90% de los machos pueden ser entrenados para montar objetos inanimados con el fin de recolectar semen mediante estos los dos métodos de colecta (Aguirre Flores, 2005).

#### **2.3.1. Vagina Artificial.**

La vagina artificial bovina modelo IMV, posee 30 cm de largo; 5 cm de diámetro. Con el fin de evitar el contacto de la eyaculación, tiene el forro de goma que podría tener un efecto adverso sobre la motilidad del espermatozoides, el mismo que se dobla sobre los extremos del rollo formando una cámara que se llena con agua caliente a 47°, con el fin de proporcionar la temperatura y presión adecuada, logrando así la eyaculación (Mosaferi et al., 2005). Arieta et al., (2014); indica que se ejecuta la recolección del eyaculado, sujetando una hembra en celo o un maniquí, es así que el operador procede a la recolección colocándose a la derecha del toro y sujetando la vagina artificial en la mano derecha, con la ranura dirigida hacia el pene del toro, mientras que con la mano izquierda se sujeta el prepucio lo dirige hacia la abertura de la vagina artificial. Luego de practicar algunas montas para estímulo del animal, se realiza la monta y recolección del material seminal, introduciendo el glándulo del toro en la vagina artificial hasta lograr la eyaculación; el eyaculado se deposita en el tubo colector. Es importante que el recipiente donde es obtenido el eyaculado sea cubierto, ya que la exposición directa a la luz y el cambio de temperatura podrían afectar las características normales del semen.

#### **2.3.2. Masaje tras-rectal.**

Palmer et al., (2005); manifiesta que el masaje trans-rectal, se efectúa específicamente hacia la región ampular del conducto deferente, lo cual hace que el toro eyacule y el material seminal sea colectado en una tasa recolectora.



Esta técnica consiste en introducir la mano y el antebrazo en el recto del animal y realizar un masaje iterativo hacia delante y atrás sobre la terminación de los conductos deferentes de las vesículas seminales y la próstata, permitiendo que el semen fluya hacia la uretra pélvica, el masaje deberá continuar en concordancia con las pulsaciones y logrando que otra persona recoja con un recipiente (Stelletta et al., 2015). A su vez esta técnica ha tenido un menor porcentaje de espermatozoides móviles y en vivo en comparación con muestras obtenidas con otros métodos; interpretado como una situación de la falta de control térmico en la colección (Palmer et al., 2005).

### **2.3.3. Electroeyaculación.**

La Electroeyaculación implica la aplicación de una serie de pulsos cortos, de bajo voltaje de corriente a estructuras genitales y los nervios pélvicos que están implicados en la respuesta eyaculatoria. El electroeyaculador es una fuente de energía que posee dispositivos para controlar la amplitud de los partes componentes y de circuitos para evitar la electrocución accidental. En segundo lugar, se necesita un tubo de recogida, por lo general adjunto a un cono de goma de látex en el que se recoge el semen. Finalmente, los pulsos de corriente se aplican a través de una sonda conectada al impulsador de energía. La sonda se inserta en el recto de tal manera que los electrodos se encuentran dentro de la cavidad pélvica la cual emite impulsos eléctricos a baja voltaje hasta conseguir el objetivo específico de la técnica mencionada (Palmer et al., 2004).

Barker (1958), indica que la colección de material seminal por la estimulación eléctrica no es considerada como un nuevo método de recolección, ya que trabajos han demostrado que los animales de granja se les pueden hacer eyacular mediante tonificación eléctrica. Este método consiste en un aparato portátil con una fuente de energía que es de 115 voltios.

Previamente para el empleo de esta técnica se debe realizar el corte de pelo del prepucio y un lavado, se lubrica la sonda y se inserta en el recto, colocado aproximadamente sobre las vesículas seminales. Una vez colocado en este lugar se procede al estímulo hasta lograr la erección y posterior eyaculación. El líquido seminal pronto comienza a ser puesto en libertad y el pene aparece en el orificio del prepucio. Al momento que se produce la eyaculación el poder de la maquina debe estar apagado gradualmente y la sonda retirada suavemente. El pene del toro se retrae inmediatamente y volverá a una posición normal. Es importante tener en cuenta que este proceso no debe durar no más de cinco minutos desde inserción de la sonda a la terminación de la eyaculación (Barker, 1958).





## **2.4. Tecnicas de evaluacion de semen fresco.**

El objetivo final de evaluación del material seminal es encontrar uno o pocos parámetros para predecir la capacidad fertilizante del esperma colectado. Muchos métodos han sido evaluados a lo largo de las últimas décadas, pero sólo unos pocos métodos han sido adoptados para la práctica. La mayoría de estos estudios han utilizado el microscopio óptico para las evaluaciones de los parámetros clásicos de esperma, incluyendo la concentración de espermatozoides, la motilidad, morfología y viabilidad y mediante sistema CASA (Januškauskas & Žilinskas, 2002).

Es importante señalar que los ensayos de laboratorio empleados para evaluar la calidad de una muestra de material seminal antes del uso en la inseminación artificial han implicado una evaluación del porcentaje de espermatozoides con morfología normal y la concentración para una dosis inseminante (Gillan et al., 2005).

### **2.4.1. Pruebas macroscópicas.**

#### **2.4.1.1. Volumen.**

El volumen tiene estrecha relación con el medio ambiente, edad y genotipo ya que en los trópicos, la producción de esperma y la calidad del semen disminuyen durante la estación caliente es decir las razas Bos indicus están mejor adaptadas al clima caliente, caso contrario las razas Bos taurus poseen mayor superficie corporal por lo que resisten mejor los climas fríos, lo cual indica que poseen mejores características en la obtención de material seminal (Brito et al., 2002).

El volumen del eyaculado del macho es medido por observación directa del tubo colector graduado indicado en ml. Por lo general los tubos colectores están protegidos con la finalidad de evitar cambios bruscos de temperatura y el efecto los rayos solares en la muestra obtenida. La mayoría de los toros proveen de 3 a 6 ml de eyaculado por monta (Muiño et al., 2005).

#### **2.4.1.2. Aspecto.**

El aspecto del semen de toro por lo general se determina por el grado de opacidad, con variaciones de denso cremoso a denso acuoso lo cual ayuda a determinar la calidad del material seminal obtenido (Cabrera & Pantoja, 2012). Curbelo & Rodríguez (2013) indican que el eyaculado, es un líquido denso y a su vez cremoso, ligeramente amarillento, que contiene espermatozoides en un contorno llamado plasma seminal, se identifica el aspecto y el valor.



#### **2.4.1.3. Olor.**

El olor es característico de cada especie animal y en general no es muy intenso. El olor del semen de toro es similar al de la leche de la vaca. El semen puede tomar un olor dependiendo del estado y condición del animal, como cuando se mezcla con orina o ya sea tal vez por procesos purulentos y por la falta de limpieza (Barszcz et al., 2012). Por lo general se lo determina olfateando el tubo colector donde se encuentra la muestra seminal, olores extraños diferente al característico indica alguna contaminación sea con orina o alguna secreción derivada de una patología genito-urinaria (Crespo & Moreno, 2014).

#### **2.4.1.4. Color.**

El color del semen del toro es blanco cremoso, en condiciones normales, que a su vez tiene relación con la cantidad y la concentración de espermatozoides contenidos en el eyaculado. Es importante tener en cuenta que la coloración varía de acuerdo al estado del animal, puede variar de un color amarillento por la presencia de riboflavina que se puede confundir con la presencia de orina; o de color rojizo a causa de una lesión (Barszcz et al., 2012).

El color del semen de toro es variable, va desde claro transparente hasta el amarillo claro y depende por lo general del método de colecta ya que por la mala aplicación de la técnica puede existir la presencia de sangre, pus y tonalidades fuera de lo normal (Sesmal et al., 2008).

#### **2.4.1.5. PH.**

En condiciones normales el semen de toro colectado recientemente posee un pH que oscila entre 6.5 a 6.9 con una media pH 6.7. El pH del semen de toro puede variar dependiendo de las condiciones del tiempo de colecta hasta su determinación en laboratorio (Moussa et al., 2002). El pH del semen está por lo general se relaciona con el método de colecta, así como de los atenciones y cuidados en el momento de ejecutar la técnica de colección del material seminal (Sesma et al., 2010).

### **2.4.2. Pruebas Microscópicas.**

#### **2.4.2.1. Motilidad masal microscópica.**

La motilidad masal del semen de toro se valora de acuerdo a la concentración, el movimiento progresivo y velocidad de los espermatozoides. Es por eso que cuando uno de estos tres principios se encuentra rebajado, las ondas que son expresadas en remolinos son duramente deprimidas o nulas (Yildiz et al., 2000).



La observación de la misma se evalúa colocando una gota de semen puro colocada en un cubre objetos atemperado a 37°C, para luego ser visualizada mediante microscopio electrónico a 40X, la misma que se valora observando la presencia de ondas cerca del borde de la gota de material seminal (Yildiz et al., 2000). La escala se clasifica de 1 a 5, en donde 1 corresponde al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven formando remolinos (Yildiz et al., 2000).

#### **2.4.2.2. Motilidad individual progresiva.**

La valoración del movimiento individual de los espermatozoides con el fin de determinar las células con movimiento flagelar del total de espermatozoides del eyaculado obtenido, observados en diferentes campos de placa puesta en el microscopio (Curbelo & Rodríguez, 2013).

La observación debe ser realizada con un microscopio óptico con un aumento de 400X, ahí se observan los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea a los cuales se los considera normales, caso contrario los que se mueven en círculo se consideran anormales. El porcentaje se obtiene de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides observados en la placa (Curbelo & Rodríguez, 2013).

#### **2.4.2.3. Concentración.**

La determinación exacta del parámetro de la concentración de espermatozoides es una prueba importante de la calidad del semen ya que una de las características que define el potencial de fertilidad del animal colectado. Es así que una vez encontrada la concentración en el semen y el volumen del eyaculado, se podrá obtener el valor de dilución y el número de dosis inseminante para lograr grados adecuados de fertilidad. Por lo general la concentración que se obtiene en el eyaculado de toro es de  $20 \times 10^6$  de espermatozoides /ml. La concentración puede ser obtenida mediante la colocación de una alícuota de semen fresco en la cámara de Neubauer, para luego realizar el conteo. Pero con el avance de la ciencia se puede obtener la concentración de espermatozoides con la utilización de un fotómetro calibrado para bovinos (Cabrera & Pantoja, 2012).

#### **2.4.2.4. Vitalidad espermática.**

En una investigación es importante un análisis básico del semen para distinguir entre los espermatozoides vivos y muertos. Una proporción de espermatozoides vivos se pueden identificar por su motilidad, mientras que la capacidad de distinguir en vivo, los espermatozoides inmóviles requiere otras técnicas.



Varios estudios se basan en la aplicación de un colorante para lo cual han desarrollado técnicas para distinguir vivo y espermatozoides inmóviles de espermatozoides muertos. Una técnica de tinción para conseguir el porcentaje de vivos y muertos es la aplicación de dos reactivos eosina y nigrosina, en mismo que se efectúa tomando una alícuota de semen fresco, se lo coloca en una placa atemperada, para luego ser aplicada una proporción de eosina-nigrosina semejante a la del semen, para luego realizar un frotis, la cual después de unos minutos es observada al microscopio y así determinar el porcentaje de vivos y muertos. Al visualizar al microscopio electrónico observamos que los espermatozoides vivos se tiñen de verde mientras que los muertos se colorean de rojo (Björndahl et al., 2004).

#### **2.4.2.5. Método de análisis de semen asistido computarizado (CASA).**

El análisis del semen es el procedimiento más comúnmente utilizado en la evaluación del potencial de la fertilidad del material genético del macho. Cabe recalcar que los parámetros analizados tradicionalmente incluyen la concentración espermática, la motilidad masal, la calidad de movimiento progresivo, y la morfología. Sin embargo, la reciente disponibilidad de un sistema automatizado para análisis, asistido por un ordenador de la densidad de esperma y las características de movimiento celular ofrece un método rápido y objetivo de análisis. Pero es importante mencionar, que las estimaciones de exactitud y precisión son necesarias antes de su uso de esta metodología para el uso ya sea de forma experimental o clínicamente. En consecuencia, hemos comparado las estimaciones de densidad de espermatozoides, la motilidad masal y velocidad lineal del esperma obtenido por una nueva técnica asistida por un computador analizador de semen, el sistema CASA (Massanyi et al., 2008).

#### **2.4.3. Procesamiento de semen.**

El uso de la inseminación artificial para lograr este objetivo se ha convertido en una integral parte de la industria láctea. Pero es así que sin la intervención del animal, la vida fértil de un eyaculado esperma de toro se limita a varias horas en el laboratorio. Si bien podemos extender la vida fértil de esperma de toro indefinidamente a través de la criopreservación, los espermatozoides congelados-descongelados son aún más frágiles y menor duración que los espermatozoides recién eyaculados. Y mientras que cada paso en la elaboración y manipulación de semen congelado es esencial para proporcionar espermatozoides viables después de la descongelación (Thun et al., 2002).



Una vez que se recolecta el esperma, empieza el declive del espermatozoide que a su vez es inalterable. La concentración de espermatozoides y la motilidad inicial se determina en última instancia, el número de espermatozoides en cada unidad de pajilla. El procesamiento inicial también incluye la adición de un cóctel de antibióticos, diseñado para controlar una amplia gama de bacterias. El eyaculado se diluye a continuación con un medio apropiado, el diluyente, para comenzar la proceso de enfriamiento del semen de toros, ya su proporcionan sustratos para los espermatozoides para generar la energía necesaria para la supervivencia y la motilidad, capacidad de amortiguación para controlar la acidez, además de proporcionar protección durante el proceso de enfriamiento y congelación. (Parks, 2015).

#### **2.4.4. Criopreservación.**

La criopreservación del semen ha sido una alternativa para la conservación de especies en peligro de extinción. Sin embargo, el semen de toros, ha sido utilizado comercialmente en el ganado lechero durante décadas, pero a su vez posee una fertilidad inferior relacionada con el proceso de criopreservación. Pero al momento se ha tratado de lograr en el ganado bovino, obtener buena fertilidad, logrando una cantidad de dosis inseminante de 20 millones de espermatozoides totales, llegando a alcanzar una dilución capaz de ser comercialmente factible (Ávila-Portillo et al., 2006). Se debe tomar en cuenta que el proceso de criopreservación posee una fertilidad reducida en comparación con semen fresco, por lo que se debe tomar en cuenta el protocolo de crioconservación para optimizar el número de sobrevivientes, sino también la capacidad funcional del total de espermatozoides (Watson, 2000). La criopreservación comprende cinco etapas: la dilución y la suma del crioprotector, el envasado y enfriamiento, la congelación, el almacenamiento y la descongelación, lo que hace que haya una articulación entre la función de la membrana con el metabolismo pudiendo que el espermatozoide detenga su función en cada etapa (Ávila-Portillo et al., 2006).

#### **2.4.5. Crioprotectores.**

La utilización de crioprotectores es muy importante en el proceso de criopreservación ya que protege a los espermatozoides durante la congelación y la descongelación, es decir evita la formación de hielo intracelular. Uno de los crioprotectores más utilizados es el glicerol, que disminuye el efecto por la estimulación osmótica de la deshidratación celular, disminuyendo así el volumen de intracelular agua disponible para la congelación (Medeiros et al., 2002).



Esto se produce mediante la sustitución de agua intracelular necesaria para el mantenimiento del volumen celular, interacción con iones y macromoléculas disminuyendo el punto de congelación del agua (Medeiros et al., 2002).

#### **2.4.6. Congelación.**

El semen se empaqueta en pajilla 0,25 o 0,5 ml. para la congelación y el almacenamiento. Las pajillas se congelan ya sea en la fase de vapor por encima de nitrógeno líquido o en una máquina de congelación a velocidad controlada. El paso de congelación es un procedimiento en el cual las células se ponen en un medio adecuado de congelación y refrigeración, seguido del punto que está por debajo de la media de congelación. La formación de hielo no necesariamente se inicia en el punto de congelación. Los cristales pequeños de hielo tienen un punto de fusión, debido a su gran tensión superficial (Holt, 2000).

La aparición de hielo es espontánea en la mayoría de los casos ocurren después del enfriado de la solución a una temperatura entre  $-5^{\circ}\text{C}$ . A partir de entonces, el hielo crecerá rápidamente en todas las direcciones, y la liberación del calor latente, hará que la muestra se empieza a calentar bruscamente hasta que la temperatura llegue al punto de congelación o fusión de la solución, este es el espacio donde la formación de hielo se detendrá, o procederá a una velocidad administrada por la velocidad a la que el calor de fusión se transporta desde la muestra (Holt, 2000).

#### **2.4.7. Descongelación.**

Los procedimientos adecuados para el manejo de la pajuela son esenciales para el mantenimiento de una óptima la viabilidad y la fertilidad de los espermatozoides en los programas de inseminación artificial ha hecho manifiesto una correlación significativa entre las características de viabilidad del esperma después de la descongelación y la fertilidad de los espermatozoides criopreservados. Un alto porcentaje de pajuelas bovinas criopreservado, procesadas a base de yema de huevo, disponibles comercialmente a los productores, por lo general se deben descongelar en agua a  $33$  a  $35^{\circ}$  por un mínimo de 40 segundos (DeJarnette, 2000).



Es importante recalcar que en condiciones ambientales adversas, como aquellos animales que son inseminados a temperatura ambiente bajo cero, lo que obliga la implementación de procedimientos de protección térmica para evitar un golpe de frío después de la descongelación en agua tibia, haciendo que se realicen procedimientos como, el esperma no esté completamente descongelado hasta el interior del ambiente cálido de la hembra tracto reproductivo y por lo tanto no está sujeto a golpe de frío, y el daño creado por choque en frío es igual o mayor en magnitud que los daños causados por la descongelación incorrecta (DeJarnette, 2000).

#### **2.4.8. Evaluación del semen post - congelación.**

La evaluación adecuada de la calidad después de la descongelación de espermatozoides es de alto interés para la industria de la IA, ya que puede proporcionar información sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados. La evaluación del semen post – descongelado consta de los siguientes parámetros: 1) Motilidad individual: en el cual se indica por medio del Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá y que se corresponden con las normas ISO 9002, los valores son: 0 horas el 25% y a las 2 horas de 15% de espermatozoides motiles; 2) Concentración: la concentración de una pajuela de 0,25ml, es de 20 millones, pero a la descongelación deberán haber por pajuela un mínimo de 10 millones de espermatozoides móviles. Luego a esta se la multiplica el resultado por 5 millones y después por el porcentaje de espermatozoides móviles obteniendo la fracción total de espermatozoides móviles por dosis inseminante (Gómez & Migliorisi, 2007).

#### **2.4.9. Prueba hipoosmótica en espermatozoides.**

Sánchez & Burgos (2013) indican que la prueba hipoosmotica, tiene como soporte en evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática de la célula espermática, considerando que el espermatozoide sea móvil y que sea capaz de realizar la fecundación, no así ocurre con el espermatozoide que se encuentra en malas condiciones y que no sea capaz de fecundar. La prueba hipoosmótica tiene como principio en la muestra de espermatozoides en un medio hipoosmótico produce un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular e intracelular, entorno que la célula compensa fisiológicamente circulando agua al medio intracelular y, como consecuencia aumenta su volumen y se observan cambios morfológicos en los flagelos o colas como enrollamiento de los mismos.





## CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.

### 3.1. Materiales.

Los materiales que se utilizaron para la realización de la investigación se clasificaron de acuerdo a su medio, en materiales biológicos, de campo, equipos e instrumentos de laboratorio y reactivos

#### 3.1.1. Materiales biológicos.

- Tres toros biotipo criollo
- Eyaculados de toros biotipo criollo.

#### 3.1.2. Materiales de campo.

Vagina artificial bovina modelo IMV Technologies®, electroeyaculador electrónico portátil marca Standard Precisión Electronics®, tasa colectora, tubos plásticos colectores de semen, termo para agua caliente, balde, termómetro, overol, botas, guantes de examinación y ginecológicos.

#### 3.1.3. Equipos e instrumentos de laboratorio.

Microscopio de contraste de fases (Olympus BX41, Olympus Europa GmbH, Hamburgo, Alemania), una platina térmica, una cámara (Basler cámara A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemania) y un adaptador de video Olympus 0.75x, microscopio electrónico, placa térmica, baño maría, porta y cubreobjetos, fotómetro calibrado para toro, microcubetas para fotómetro, vasos de precipitación de 5 ml y 10ml, pipetas automáticas de 10 µl, 20 µl y 200 µl, matraz Erlenmeyer de 200ml, pinzas de disección, pajuelas de 0,25 ml de capacidad, goblets de 10mm y 35 mm para almacenar pajuelas, refrigeradora, rampa para congelación, tanque criogénico de 20kg., nitrógeno líquido.

#### 3.1.4. Reactivos.

Diluyente seminal (AndroMed®), Alcohol Polivinílico, Eosina (5%) y Nigrosina (10%), Fructosa (0.675 g/l) y citrato de sodio (0.268g/l), P.O. 55 mOsm/l, Agua bidestilada.

### 3.2. Caracterización de la unidad de análisis.

Las unidades experimentales y de análisis fue el semen de bovino biotipo criollo, colectados con vagina artificial y electroeyaculador, envasado en pajuelas, criopreservado y posteriormente descongelado. Las muestras de semen se obtuvieron de tres 3 toros biotipo criollo, los cuales fueron colectados 10 veces, posteriormente procesados con dos diluyentes deferentes.





De las pajuelas congeladas de cada colecta se descongelaron y evaluaron 10 unidades, dando un total 600 unidades experimentales estudiadas.

### **3.3. Lugar de la Investigación.**

La investigación se realizó en las instalaciones y laboratorio de biotecnología de la Granja Experimental de IRQUIS propiedad de la Universidad de Cuenca, donde se efectuó el trabajo de campo, es decir la colección, el procesamiento y la evaluación del material seminal. La granja de Irquis esta ubicada en el km 23 de vía Cuenca – Girón, en la parroquia Victoria del Portete a 2670 msnm, con una temperatura que oscila entre 3 y 12°C. Georeferencia X= 17M714057 / Y= 9659226

### **3.4. Reproductores.**

Para la investigación se seleccionaron 3 toros biotipo criollo como donadores de semen, clínicamente sanos, para ser trasladados a la Granja de IRQUIS, en donde pasaron un tiempo de adaptación y preparación. Previo al estudio se les efectuó un examen clínico general (condición corporal, alteraciones musculoesqueléticas, alteraciones de patas y pezuñas), un examen genital externo (testículos, escroto, epidídimo y pene) y un examen genital interno (palpación de vesículas seminales y ámpula)

### **3.5. Metodología de trabajo.**

#### **3.5.1. Preparación de los toros donantes.**

Los toros biotipo criollo se trasladaron a la Granja Experimental IRQUIS, donde se les sometió a un proceso de adaptación. Los animales fueron entrenados 20 días previos a las colectas con vagina artificial o con electroeyaculador.

Se realizó un corte del bello prepucial y limpieza antes de las colectas; además de un lavado con Cloruro de Sodio al 0,9%.

#### **3.5.2. Excitación pre-coital.**

Para el método VA se realizó un proceso de montas falsas y entrenamiento, utilizando el método XXRX, donde X: Monta Falsa y R: Reposo activo. En esta etapa se armó y preparó la vagina artificial, cada tubo colector de semen se identificó con el registro al que pertenece cada toro.



Previo a la colecta con EE se realizó un masaje trans-rectal de aproximadamente dos minutos promedio, antes de introducir el electrodo, dando tiempo a la preparación de la tasa de colecta con su respectivo tubo colector rotulado con el registro de cada toro.

### **3.5.3. Colección del semen.**

#### **3.5.3.1. Vagina artificial.**

La vagina artificial que se utilizó es un modelo IMV Technologies® y estaba constituido por un tubo rígido cilíndrico de 30 cm de longitud, con una manga de goma en su interior y una válvula ubicada en un extremo donde se introdujo agua a una temperatura entre 45 a 50°C; en uno de sus extremos estaba conectado a un embudo donde se colocó el tubo colector. Todas las colectas fueron ejecutadas por el mismo técnico, bajo las mismas condiciones, es decir, en un orden determinado de los toros, a la misma hora en la mañana, dos veces por semana, hasta completar diez sesiones de colecta.

#### **3.5.3.2. Electroeyaculador.**

Para aplicar este método de colecta, fue necesario disponer de una manga resistente y segura para inmovilizar al animal. Tras realizar el masaje rectal para facilitar la posterior excitación, se introdujo el dispositivo que posee en su parte ventral tres electrodos que emitían pulsos de electricidad de bajo voltaje, dando lugar a un ciclo de estimulaciones de 2 segundos.

Estos pulsos comenzaron en 0 MA y se fueron elevando gradualmente hasta alcanzar 150 MA promedio, dejando entre ellas pausas de dos segundos de descanso, consiguiendo con ello la erección y posterior eyaculación.

Todas las colectas fueron ejecutadas por un equipo de profesionales distribuidos adecuadamente, bajo las mismas condiciones, en un orden determinado de los toros, en la mañana, dos veces por semana, hasta completar diez sesiones de colecta.

### **3.5.4. Evaluación de semen fresco.**

Para la evaluación fue necesario que el semen se mantuviera protegido de los cambios violentos de temperatura, contacto con el agua, radiación solar y contaminaciones. El material en contacto con el eyaculado fue de plástico y a su vez estuvo a una temperatura aproximada de 37°C. La observación del color del semen, así como la valoración de su motilidad masal, fueron necesarias para decidir si se procedería a utilizar el eyaculado.



#### **3.5.4.1. Volumen del eyaculado.**

Esto se realizó valorando el volumen obtenido en el tubo de colecta. El volumen del eyaculado de los toros varió entre 2 y 5 ml por colecta.

#### **3.5.4.2. Concentración espermática.**

La concentración establecida para la crioconservación fue de  $500 \times 10^6$ /ml de espermatozoides determinada mediante fotómetro Minitube® calibrado para toro. El procedimiento para la obtención de la concentración consistió en tomar semen puro con una pipeta automática y luego colocar una gota en la microcubeta que es fijada en la posición para efectuar la medición. Posteriormente se activó el análisis para las lecturas de la concentración espermática.

#### **3.5.4.3. Motilidad Masal.**

La evaluación de la motilidad masal expresada en porcentajes, se estableció por observación en el microscopio óptico a 40X, al mismo que se le adaptó una cámara para visualizar en un monitor, colocando una gota de semen puro sobre un portaobjetos temperado a 37°C, evaluando en el borde de la gota las ondas efectuadas por los espermatozoides, en donde el valor adecuado de motilidad masal en una escala de 0 a 5 fue de 3,5 equivalente al 70% de vivos motiles.

#### **3.5.4.4. Motilidad Individual Progresiva.**

La evaluación de la motilidad individual progresiva se expresó en porcentajes. Una vez diluido el semen se tomó una gota de la dilución de 10  $\mu$ l y se colocó sobre un portaobjetos atemperado a 37°C y se puso a ésta un cubreobjetos. Se observó un campo al microscopio óptico a 400X, al mismo que se le adaptó una cámara para visualizar en un monitor, y se valoró los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, mientras que los que giraron en círculo se consideran que tienen movimientos anormales.

El porcentaje de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo del total fue del 50 % el mismo que se consideró aceptable en el experimento.

#### **3.5.4.5. Vitalidad espermática.**

Se realizó aspirando con una pipeta automática una gota de 5  $\mu$ l de semen puro y se adiciono una gota de eosina – nigrosina, a continuación, se hizo un frotis con la lámina cubreobjetos para luego ser colocada en una placa térmica a 37°C.



Después de unos 10 segundos se observó al microscopio, que tenía con una cámara para ser visualizada en un monitor, realizando la valoración y conteo de 200 espermatozoides y se discriminó entre espermatozoides vivos (con cabeza blanca) y espermatozoides muertos (con cabeza roja).

#### **3.5.4.6. Anormalidades espermáticas.**

Se realizó el conteo de 200 espermatozoides utilizando la misma placa en la que se valoró la vitalidad espermática, de ellos se evaluó el porcentaje de células anormales al igual que los espermatozoides con colas dobladas que había en el frotis.

#### **3.5.5. Procesamiento del semen.**

Para el procesamiento del semen, se preparó la solución madre a base de diluyente AndroMed®, el mismo que contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

##### **3.5.5.1. Cálculo del número de espermatozoides en el eyaculado y cantidad de diluyente.**

Para la inseminación artificial es necesario tener una concentración espermática de  $10 \times 10^6/\text{ml}$ ., pero en condiciones de campo casi la mitad de espermatozoides por dosis inseminante pueden morir durante el proceso de congelación o descongelación. Por lo tanto, para el cálculo de la dilución antes del procesamiento se debe manejar una concentración mínima de  $20 \times 10^6/\text{ml}$  de espermatozoides por dosis inseminante. Para conocer la cantidad de diluyente total se trabajó con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de Pajuelas} = \frac{\text{Volumen eyaculado} \times \text{concentración de espermatozoides}}{\text{Concentración de espermatozoides por pajuela}}$$

El resultado obtenido se multiplicó por 0,25 que es el volumen de cada pajuela, obteniéndose la composición final. Para el cálculo de la cantidad de diluyente se realiza la siguiente operación:

$$\text{Cantidad de diluyente} = (\text{Dilución total}) - (\text{Volumen Eyaculado})$$

Estos cálculos se realizaron tanto para las colectas realizadas con vagina artificial y con electroeyaculador.



#### **3.5.6. Dilución de semen.**

Luego de realizar los cálculos, se preparó la solución madre a base de diluyente AndroMed®, a una concentración del 20% con agua destilada pura a 37°C. Se mezcló 2.5 ml de diluyente en 10 ml de agua destilada y se realizó una pre-dilución del semen en relación 1:1 a la misma temperatura y luego se ajustó hasta una temperatura de 35°C. Se hizo la dilución completando el total de la solución madre, calculando que estuviera a una concentración de  $20 \times 10^6$  ml espermatozoides por dosis.

#### **3.5.7. Preparación de las pajuelas.**

Se rotularon con marcador permanentes las pajuelas con el nombre de cada toro y la fecha en que se realizó la colecta.

#### **3.5.8. Envasado del semen.**

Se envasaron manualmente pajuelas de 0.25 ml, que fueron selladas con el alcohol polivinílico, se colocaron en un globet con agua destilada para luego ser colocadas en refrigeración.

#### **3.5.9. Tiempo de equilibrio.**

Una vez colocadas las pajuelas en refrigeración, se controló con un termómetro el descenso de la temperatura hasta 5°C, luego las pajuelas se colocaron en una rampa durante 2 horas, tiempo durante el cual se logró el equilibrio.

#### **3.5.10. Crioconservación del semen.**

Las pajuelas colocadas en la rampa, fueron ubicadas en una caja a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido (NL) para ser sometidas a sus vapores por un tiempo de 10 minutos, luego se dejaron caer en el NL para su criopreservación a  $-196^{\circ}\text{C}$  y se almacenaron en un termo criogénico.

#### **3.5.11. Descongelamiento.**

A los 30 días de iniciada la criopreservación, se tomaron 2 pajuelas de cada toro, por fecha de extracción y método de colecta, sometiéndolas al proceso de descongelación en baño María a una temperatura de 37°C por 30 segundos para su respectiva evaluación.

### **3.5.12. Evaluación del semen descongelado.**

#### **3.5.12.1. Evaluación por el sistema de microscopía óptica.**

##### **3.5.12.1.1. Motilidad Individual progresiva espermática.**

Se valoró la motilidad individual progresiva y se determinó por observación en el microscopio óptico el cual tenía adaptado una cámara para visualizar en un monitor, a 400X. Se colocaron 10  $\mu$ l de semen descongelado en un portaobjetos temperado a 37°C y los resultados de la evaluación se expresaron en porcentajes.

##### **3.5.12.1.2. Vitalidad espermática.**

Se evaluó la viabilidad y morfología espermática post descongelación, tal como se describió para el semen. Se mezcló una gota de 5  $\mu$ l de semen puro con una gota de eosina – nigrosina, luego se hizo un frotis en una lámina portaobjetos y luego se colocó en una plancha térmica a 37°C. Después de unos segundos se observó al microscopio óptico, que estaba adaptada una cámara para ver la imagen en una pantalla. Se contaron 200 espermatozoides y se determinaron los porcentajes de espermatozoides vivos (con cabeza blanca) y espermatozoides muertos (con cabeza roja).

##### **3.5.12.1.3. Anormalidades espermáticas.**

Posteriormente, también se realizó el conteo de 200 espermatozoides, utilizando la misma placa en la que se valoró la vitalidad espermática, de los cuales se evaluó el porcentaje de células anormales y los espermatozoides con colas dobladas.

##### **3.5.12.1.4. Funcionalidad de la membrana plasmática (HOST Test).**

La prueba HOST se llevó a cabo como se describe a continuación: Se incubó en baño María a 37°C, durante 45 minutos, utilizando tubos Ependorf, una alícuota de 10  $\mu$ l de semen descongelado de cada toro, diluido con 100  $\mu$ l solución hipoosmótica, conteniendo 0.675 g/l de D-fructosa y 0.268 g/l de citrato de sodio, agua bidestilada, peso osmolar 55 mOsm/l (miliosmoles/litro). Transcurrido el tiempo indicado, se colocó una gota en el portaobjetos, para luego ser visualizados mediante microscopio óptico (100X), que tenía adaptado una cámara para su observación. La valoración fue expresada en porcentajes, considerando respuesta positiva a los diferentes grados de curvatura de colas espermáticas realizando un recuento de 200 espermatozoides por muestra y los que los que presentaron cola recta se indicaban negativos.



### 3.5.12.2. Evaluación por sistema CASA.

La evaluación mediante el sistema CASA, consistió en evaluar la motilidad por segunda instancia, para lo cual el sistema fue calibrado a una orientación estándar para evaluación de semen de toro. Las evaluaciones se realizaron poniendo 20  $\mu$ l de semen descongelado en una cámara Leja sobre una platina térmica a 38°C, el software grabó 30 movimientos y 6 campos de espermatozoides con una ampliación de 200X. Los parámetros medidos fueron: porcentaje de espermatozoides motiles con relación al total (TM), el porcentaje de espermatozoides con movimientos progresivos (IPM), células espermáticas con desplazamiento hacia delante y el porcentaje de células con motilidad local (LM) que evaluó los espermatozoides con movimiento circular y el porcentaje de espermatozoides inmóviles (IS). La suma de TM más IS corresponde al total de la cinética espermática.

### 3.6. Diseño experimental y estadístico.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) y para determinar los grados de significación los datos fueron sistematizados y analizados en el programa estadístico SPSS versión 22.0. En la evaluación de calidad espermática precongelación se consideró como variable independiente el método de colecta (T1=VA, n=30 y T2=EE, n=30) y como variables dependientes la concentración espermática (C), la motilidad masal (MM), la motilidad individual progresiva (MIP), la vitalidad espermática (VE), y las anomalías totales (AT). En la evaluación post-descongelación las variables independientes fueron el método de colecta (T1=VA, n=60 y T2=EE, n=60) y el sistema de evaluación (CASA y microscopía óptica), mientras que las variables dependientes fueron la MIP, VE, AT, las anomalías de la cola (AC) y el Hos-test para la evaluación con microscopía óptica, y la motilidad total (MT), movimiento progresivo individual (MPI), motilidad local (ML) y espermatozoides inmóviles (IS) para la evaluación con el sistema CASA. La normalidad y homogeneidad de los datos se comprobó mediante las pruebas de Shapiro Wilk y Levene respectivamente. Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y para determinar diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) entre las medias ajustadas se aplicó la prueba U de Mann Wihney. Los resultados son presentados como promedios  $\pm$  error estándar de la media (MEDIA  $\pm$  SE).



Tabla 1. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADOR	ESCALA
INDEPENDIENTE	Semen de toro	Vagina Artificial	Modelo IMV que consiste en un tubo cilíndrico, equipado de una válvula con tapa, de caucho, tienen 40 a 50 cm. de largo y 7 a 10 centímetros de diámetro.
		Electroeyaculador	Electroeyaculador electrónico portátil marca Standard Precisión Electronics con tasa colectora
DEPENDIENTE	Viabilidad espermática	Motilidad Masal	0. Ausencia de espermatozoides móviles. 1. Algunos espermatozoides se mueven en su sitio. 2. Presencia de espermatozoides móviles, pero insuficiente cantidad como para formar ondas. 3. Presencia de ondas o remolinos muy lentos (50-70% espermatozoides motiles). 4. Las ondas o remolinos se forman rápidamente (70-90% espermatozoides motiles). 5. Velocidad de formación de ondas extremadamente alta (>90% de espermatozoides motiles).
			a. Progresivo rectilíneo: espermatozoides con movimiento activo y energético con desplazamiento en sentido de avance o con motilidad individual progresiva (MIP). b. Ondulatorio: movimiento lento, con pequeño desplazamiento originado por golpes lentos y laterales de la cola en toda su extensión. c. Rotatorio: movimientos sobre sí mismo con un radio reducido y cierta velocidad. d. Espermatozoides sin motilidad.
		Vitalidad espermática	Valoración superior a al 30% a los 5 minutos de incubación a 36 °C -Espermatozoides viables: sin colorear -Espermatozoides no viables: coloreadas
		Anormalidades espermáticas	Conteo de 200 espermatozoides expresamos en porcentaje la cantidad células anormales: -Aceptable: < 15% esp. anormales -Baja calidad: > 15% de esp. Anormales.



## CAPITULO IV: RESULTADOS

## 4.1. Evaluación pre congelación.

La Tabla 2 muestra las características seminales antes de la congelación. Como se observa la concentración espermática, la motilidad masal (MM) y la motilidad individual progresiva (MIP) fueron superiores en los eyaculados obtenidos con vagina artificial (VA) que con electroeyaculador. Asimismo, el material seminal colectado con VA presentó menor porcentaje de anomalías totales (AT) que el obtenido con EE.

**Tabla 2. Media y error estándar de las características espermáticas precongelación.**

Variables de calidad espermática	Método de colecta	MEDIA $\pm$ SE	95% Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
<b>C (esp. x 10<sup>6</sup>/ml)</b>	<b>VA</b>	1059,9 $\pm$ 54,16 <sup>a</sup>	949,1	1170,7
	<b>EE</b>	771,6 $\pm$ 70,43 <sup>b</sup>	627,5	915,7
<b>MM</b>	<b>VA</b>	4,6 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	4,4	4,8
	<b>EE</b>	3,5 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	3,2	3,8
<b>MIP (%)</b>	<b>VA</b>	87,5 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	84,3	90,7
	<b>EE</b>	75,8 $\pm$ 1,54 <sup>b</sup>	72,7	79,0
<b>VE (%)</b>	<b>VA</b>	86,5 $\pm$ 1,22	84,0	89,0
	<b>EE</b>	87,4 $\pm$ 1,42	84,5	90,3
<b>AT (%)</b>	<b>VA</b>	10,3 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	8,7	11,9
	<b>EE</b>	13,1 $\pm$ 0,98 <sup>b</sup>	11,1	15,1

**SE:** Error estándar de la media; **VA:** Vagina Artificial; **EE:** Electroeyaculador. **C:** concentración; **MM:** motilidad masal; **MIP:** motilidad individual progresiva; **VE:** vitalidad espermática; **AT:** anomalías totales. Para cada variable letras diferentes en cada columna muestra significancia ( $P < 0,05$ )

## 4.2. Evaluación post-congelación.

### 4.2.1. Variables evaluadas por microscopía óptica.

La Tabla 3 indica las características del semen descongelado que fueron evaluadas por microscopia óptica. Se aprecia que la motilidad individual progresiva (MIP), la vitalidad espermática (VA), y las anormalidades totales (AT) no presentaron diferencias significativas entre métodos de colecta. Sin embargo, las muestras colectado con EE presentaron menor porcentaje de anormalidades de la cola (AC) y mayores valores en el test de HOST que los obtenidos con VA ( $P < 0,05$ )

**Tabla 3. Media y error estándar de las variables de calidad espermática post-congelación evaluadas mediante microscopia óptica**

Variables de calidad espermática	Método de colecta	MEDIA $\pm$ SE	95% Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
MIP (%)	VA	46,3 $\pm$ 2,13	42,0	50,6
	EE	51,3 $\pm$ 2,58	46,1	56,5
VE (%)	VA	53,8 $\pm$ 2,53	48,7	58,9
	EE	59,1 $\pm$ 2,40	54,3	64
AT (%)	VA	15,0 $\pm$ 0,96	13,0	16,9
	EE	12,6 $\pm$ 1,00	10,6	14,6
AC (%)	VA	16,8 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>	20,2	26,7
	EE	23,4 $\pm$ 1,24 <sup>b</sup>	14,3	19,3
HOS-Test (%)	VA	15,3 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	13,1	17,4
	EE	20,0 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	17,8	22,2

**SE:** Error estándar de la media; **VA:** Vagina Artificial; **EE:** Electroeyaculador. **MIP:** motilidad individual progresiva; **VE:** vitalidad espermática; **AT:** anormalidades totales. **AC:** anormalidades de la cola. Para cada variable letras diferentes en cada columna muestra significancia ( $P < 0,05$ )

#### 4.2.2. Variables determinadas por sistema CASA.

La Tabla 4 indica las características del semen descongelado evaluado mediante el sistema CASA. El análisis estadístico indica que ninguna de las variables evaluadas mostró diferencias estadísticas entre métodos de colección seminal.

**Tabla 4. Media y error estándar de las variables de calidad espermática post-congelación evaluadas mediante el sistema CASA**

Variables de calidad espermática	Método de colecta	MEDIA $\pm$ SE	95% Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior
<b>MT</b>	<b>VA</b>	39,7 $\pm$ 3,5	35,6	43,3
<b>(%)</b>	<b>EE</b>	43,4 $\pm$ 2,6	39,6	49,2
<b>MPI</b>	<b>VA</b>	29,3 $\pm$ 3,24	26,2	33,1
<b>(%)</b>	<b>EE</b>	22,2 $\pm$ 1,40	19,7	25,3
<b>ML</b>	<b>VA</b>	10,7 $\pm$ 1,0	16,2	7,8
<b>(%)</b>	<b>EE</b>	21,0 $\pm$ 2,3	24,6	18,7
<b>IS</b>	<b>VA</b>	60,8 $\pm$ 3,9	64,4	57,4
<b>(%)</b>	<b>EE</b>	56,8 $\pm$ 2,6	61,9	52,9

**SE:** Error estándar de la media; **VA:** Vagina Artificial; **EE:** Electroeyaculador. **MT:** espermatozoides móviles totales; **MPI:** espermatozoides con movimiento progresivo; **ML:** espermatozoides con motilidad local. **IS:** espermatozoides inmóviles. Para cada variable letras diferentes en cada columna muestra significancia ( $P < 0,05$ )



## **CAPITULO V: DISCUSIÓN**

Se ha indicado que los bovinos criollos poseen cualidades, como el elevado instinto materno, rusticidad y alta capacidad para aprovechar el poco alimento que existe en la zona, a su vez de ser un animal con un libido y calidad seminal que va en aumento con la edad, el semen de esta raza criolla presenta excelentes valores de calidad seminal. Asimismo, estos animales poseen una leve baja concentración espermática en comparación a otras razas, aunque tienen un mayor volumen y motilidad masal e individual, logrando obtener un mayor número de dosis por eyaculado en procesos de criopreservación (Aguirre et al., 2011).

En este estudio se evaluó la calidad y congelabilidad del semen de ganado criollo obtenido mediante vagina artificial y electroeyaculador, para establecer el mejor método para la criopreservación del germoplasma de animales de este biotipo. Los resultados de la evaluación precongelación indican que con la excepción de la vitalidad espermática que fue estadísticamente similar entre métodos de colección, las demás variables (Tabla 2) fueron significativamente mejores en las muestras de semen colectadas con vagina artificial.

Asimismo, la VA tuvo algunas ventajas comparativamente con el EE, cuando la calidad seminal post-congelación fue evaluada mediante microscopia óptica (Tabla 3), pero fue estadísticamente similar a la EE cuando el semen fue evaluado mediante el sistema CASA.

Existen estudios que han comparado la calidad del material seminal obtenido por los dos métodos considerados en este estudio. En tal sentido, estos reportes han indicado resultados contradictorios. Por ejemplo, Memon et al. (1986), indicaron que las colectas obtenidas con VA presentaron mejores valores de calidad seminal que los obtenidos con EE. En la actualidad el procesamiento de semen comercial ha obtenido buenos resultados de calidad seminal con el uso de la vagina artificial como método de colecta en toros (Barth, 2004).

Por lo general, los machos no presentan problemas de entrenamieto al momento de la colecta con VA (Gibbons, 2002) son facilmente acostumbrados a la rutina de la colección frecuente de semen. Por otra parte, el metodo de EE facilita colectar semen a toros sin entrenamiento, difíciles de manejar, con baja libido y con problemas físicos (Pinto et al., 2012). A su vez, el uso del EE ha permitido la observacion de alteraciones o inconvenientes que tienen relacion con el bienestar animal (Mozo et al., 2015). Según la opinion de Gizejewski (2004), el semen de toro obtenido con electroeyaculador tiene menor calidad en relación con el esperma colectado con vagina artificial.



En la década de los 60 se realizó un estudio en el que se seleccionaron 12 toros de raza Herford, y se utilizaron 2 métodos de colecta de semen, VA y EE, durante 2 meses, 4 semanas utilizando el primer método y las cuatro siguientes con la otra técnica. Se realizaron 2 colectas por semana, y se encontró que volumen de semen recogido con VA fue menor que el obtenido con EE, mientras que la concentración ( $VA=625 \times 10^6$  esp/ml vs  $EE=293 \times 10^6$  esp/ml) y la motilidad ( $VA=2,7$  vs  $EE=2,2$ ) fue mayor en las colectas obtenidas con VA que con EE. (Austin, Hupp, & Murphree, 1961). Jiménez-Rabadán et al. (2012), evaluaron 7 machos cabríos de la raza Blanca Celtibérica y determinaron que los eyaculados obtenidos con VA tuvieron una mayor calidad, con una concentración antes de la congelación ( $VA=2487,2 \times 10^6$  vs  $EE=1163,0 \times 10^6$  esp/ml), y una motilidad espermática ( $VA=82,2\%$  vs  $EE=80,5\%$ ) mayor con VA que con EE.

Ledesma et al., (2014) analizó los eyaculados de cinco machos Corriedale, que se colectaron de forma rutinaria, alternadamente durante 12 días, mediante los métodos VA y EE, y encontró un mayor número de espermatozoides con membrana plasmática y mitocondrias intactas en los eyaculados recogidos con EE comparados con los recolectados por VA. También observó que las muestras seminales colectados con EE tienen una mayor proporción de plasma seminal debido a la estimulación que los impulsos eléctricos ejercen sobre las glándulas sexuales.

Palmer et al. (2005), evaluó el semen de 39 toros de ganado de engorde, de un año de edad, que estaban acostumbrados a ser manipulados por masaje rectal (MR) seguido inmediatamente por EE. El tiempo máximo permitido para la recogida de semen por ambos métodos fue de 4 minutos. La concentración espermática ( $EE=724 \times 10^6$  esp/ml vs  $RM=320 \times 10^6$  esp/ml), movilidad progresiva ( $EE=60\%$  vs  $RM=50\%$ ) y vitalidad espermática ( $EE=78\%$  vs  $RM=67\%$ ) fue consistentemente mayor con el EE que con el MR.

Los hallazgos anteriores coinciden con los de este estudio en el que se obtuvo eyaculados de 3 toros biotipo criollo, y en el que las variables de la calidad seminal precongelación fue superior con VA que con EE: concentración ( $VA=1059,9 \times 10^6$  esp/ml vs  $EE=771,6 \times 10^6$  esp/ml), MM ( $VA=4,6$  vs  $EE=3,5$ ), MIP ( $VA=87,5\%$  vs  $EE=75,8\%$ ), AT ( $VA=10,3\%$  vs  $EE=13,1\%$ ).

León et al., (1991), evaluaron características del semen fresco y después de la descongelación, en 30 toros cebú. La evaluación seminal determinó una mayor concentración antes de la congelación ( $VA=1053 \times 10^6$  vs  $EE=786 \times 10^6$  esp/ml) y mejor motilidad progresiva después de la descongelación del esperma ( $VA=46\%$  vs  $EE=38\%$ ) en las muestras de semen colectadas con VA que con EE; mientras que el volumen del eyaculado ( $EE=7,4$  ml vs  $VA=6,4$  ml) y el pH del semen ( $VA=6,96$  vs  $EE=7,0$ ) fue mayor en el semen colectado con EE que con VA.



Como se esperaba, se encontraron diferencias significativas entre los métodos de recolección obtenidos por EE, los cuales tuvieron mayor volumen y menor concentración espermática que los obtenidos VA; a la descongelación el método de recolección por EE mostro significancia la MIP (Foster et al., 1970).

Los métodos para la evaluación de la calidad del espermatozoides han mejorado notablemente en las últimas décadas, empezando por la evaluación de formas morfológicas y análisis de motilidad subjetiva hacia el análisis más sofisticado de los cambios moleculares en la cromatina, las membranas y las actividades catabólicas de la propia célula espermática y la concentración de iones, o la función de los organelos diferentes que ha su vez parece correlacionarse con el grado de viabilidad de los espermatozoides después de los procedimientos de congelación y descongelación (Januškauskas & Žilinskas, 2002).

Marco-Jiménez et al., (2005) valoraron el semen que fue recogido de forma rutinaria de ocho carneros Guirra utilizando dos métodos de colecta VA y EE, alternadamente 1 vez por semana durante 10 semanas, obteniendo como resultado que la concentración de los espermatozoides fue afectada por el método de recolecta, con un número significativamente menor de espermatozoides por mililitro en los eyaculados obtenidos por EE =  $6,9 \times 10^9$  que por VA =  $5,2 \times 10^9$ , al igual que las anomalías espermáticas se obtuvieron los resultados (VA = 8,1% vs EE=9,1%), así mismo mediante el sistema CASA analizo el semen fresco donde los resultados con VA (MT=69% VC=127,7  $\mu\text{m/s}$ , VLR= 74,8  $\mu\text{m/s}$ ), EE (MT=71,9% VC=159,4  $\mu\text{m/s}$ , VLR= 77,6  $\mu\text{m/s}$ ) no mostraron niveles de significancia.

De igual manera se evaluó el semen descongelado mediante sistema CASA, donde se expresaron resultados, con VA (MT=40,3% VC=128,1  $\mu\text{m/s}$ , VLR= 68,2  $\mu\text{m/s}$ ), EE (MT=39,6% VC=126,6  $\mu\text{m/s}$ , VLR= 65,8  $\mu\text{m/s}$ ) dando como resultado una calidad similar entre los dos métodos de colecta (Marco-Jiménez et al., 2005). Por el contrario, en esta investigación se obtuvieron resultados post descongelación diferentes a los indicados en la cita anterior, ya que ni la MIP (VA=46,3% vs EE=51,3%) ni la VE (VA=53,8% vs EE=59,1%) fueron estadísticamente diferentes, mientras que el test de HOS presentó alta significancia (VA=15,3% vs EE=20,0%) a favor de la VA, mientras que el porcentaje de anomalías de la cola favorecieron fueron menores en muestras de semen colectadas con EE. atribuyendo a la VA como el mejor método de colecta. Así mismo en la investigación se pudo determinar mediante el sistema CASA, que no existe ninguna diferencia estadística entre métodos de colección de material seminal de toro criollo en estudio.



## **CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

- El semen fresco de bovinos criollos colectado con vagina artificial presentó mejores parámetros de calidad precongelación que con el electroeyaculador, tanto en la concentración espermática, motilidad masal (MM), la motilidad individual progresiva (MIP) como en las anormalidades totales (AT). Sin embargo, la vitalidad espermática fue estadísticamente similar entre métodos de colecta.
- En la evaluación seminal post descongelación con microscopia óptica se encontró que la motilidad individual progresiva (MIP), la vitalidad espermática (VA) y las anormalidades totales (AT) no presentaron diferencias significativas entre métodos de colecta, aunque las muestras colectadas con EE presentaron menor porcentaje de anormalidades de la cola (AC) y mayores valores en el test de HOST que los obtenidos con VA.
- Los resultados de la evaluación seminal post descongelación mediante el sistema CASA indicaron que la motilidad total (MT), el movimiento progresivo individual (MPI), la motilidad local (ML) y los espermatozoides inmóviles (IS) fueron estadísticamente similares entre VA y EE.

## **RECOMENDACIONES**

- Utilizar vagina artificial como método de colecta permite obtener semen con parámetros óptimos para la crioconservación.
- Realizar futuras investigaciones en el laboratorio de biotecnología de IRQUIS, comparando los dos métodos de colecta en otras razas de toros y crear bancos de germoplasma.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguirre, L., Bermeo, A., Maza, D., & Merino, L. (2011). *Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE)*. Recuperado el 22 de 06 de 2016, de [http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo\\_110\\_lin\\_photo/articulos/2011/Aguirre2011\\_1\\_392\\_396.pdf](http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Aguirre2011_1_392_396.pdf)
- Aguirre Flores, V., Orihuela Trujillo, A., & Vázquez Rosales, R. (2005). Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. *Veterinaria México*.
- Aké-López, R., Sánchez-Encalada, W., & Mérida, A. D. (1997). Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino. *Rev Biomed*, 8, 21-26.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895-907.
- Arieta, R., Fernández, J., & Menchaca, J. (2014). Métodos de Extracción de Semen Bovino. *REDVET*, 15(5), 1-8.
- Austin, J. W., Hupp, E. W., & Murphree, R. L. (1961). Comparison of Quality of Bull Semen Collected in the Artificial Vagina and by Electroejaculation 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 44(12), 2292-2297.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.
- Barker, C. A. (1958). The Collection Of Semen From Bulls, Rams, and Bucks By Electro-Ejaculator. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 22(1), 3.
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., & Kupczyńska, M. (2012). Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*, 4(3).
- Barth, A. D., Arteaga, A. A., Brito, L. F., & Palmer, C. W. (2004). Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. 84(3), 315-325.





- Björndahl, L., Söderlund, I., Johansson, S., Mohammadieh, M., Pourian, M. R., & Kvist, U. (2004). Why the WHO Recommendations for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change. *Journal of andrology*, 25(5), 671-678.
- Brito, L. F., Silva, A. E., Rodrigues, L. H., Vieira, F. V., Deragon, L. A., & Kastelic, J. P. (2002). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* Al bulls in Brazil. *Animal reproduction science*, 70(3), 181-190.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200.
- Celeghini, E. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F., Nascimento, J., Raphael, C. F., & & Rodrigues, P. H. (2008). Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal reproduction science*, 104(2), 119-131.
- Curbelo Curbelo, M., & Rodríguez Rodríguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay*. Recuperado el 26 de 06 de 2016, de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/handle/123456789/2730>
- Crespo, E., & Moreno, A. Q. (2014). Calidad seminal de toros criollo limonero. *Revista Científica*, 24(6), 518-525.
- DeJarnette, J. M., Barnes, D. A., & Marshall, C. E. (2000). Effects of pre-and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 53(6), 1225-1238.
- Foote, R. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80(E-Suppl\_2), 1-10.
- Foster, J., Almquist, J. O., & Martig, R. C. (1970). Reproductive capacity of beef bulls. IV. Changes in sexual behavior and semen characteristics among successive ejaculations. *Journal of animal science*, 30(2), 245-252.
- Garner, D., & Seidel, G. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriotechnology*, 69(7), 886-895.
- Gibbons, A. (2002). Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora. *Revista Taurus CT*, 413.



- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Gizejewski, Z. (2004). Effect of season on characteristics of red deer (*Cervus elaphus* L.) semen collected using modified artificial vagina. *Reprod Biol*, 4(1), 51-66.
- Gómez, M., & Migliorisi, A. L. (2007). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Cátedra Reproducción Animal Facultad de Cs. Veterinarias-UNLP. Buenos Aires, Argentina*.
- Hernández, J. J., Rodríguez, O., & Everardo, G. P. (1976). Evaluación de cuatro métodos para colección de semen en borrego tabasco o pelibuey. (30), 45-51.
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 62(1), 3-22.
- Huanca, W. (2001). Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas lecheras. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 161-163.
- Januškauskas, A., & Žilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Del Olmo, E., Pérez-Guzmán, M. D., & ... & Soler, A. J. (2012). Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal reproduction science*, 132(1), 88-95.
- Ledesma, A., Manes, J., Cesari, A., Alberio, R., & Hozbor, F. (2014). Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2), 324-332.
- Leon, H., Porras, A. A., Galina, C. S., & Navarro-Fierro, R. (1991). Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. *Theriogenology*, 36(3), 349-355.
- Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J., & Viudes-de-Castro, M. (2005). Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64(8), 1756-1765.



- Marco-Jiménez, F., Vicente, J. S., & Viudes-de-Castro, M. P. (2008). Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reproduction in domestic animals*, 43(4), 403-408.
- Massanyi, P., Chrenek, P., Lukac, N., Makarevich, A. V., Ostro, A., Zivcak, J., & Bulla, J. (2008). Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak J Anim Sci*, 41, 60-66.
- Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Memon, M. A., Bretzlaff, K. N., & Ott, R. S. (1986). Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, 26(6), 823-827.
- Mosaferi, S., Niasari-Naslaji, A., Abarghani, A., Gharahdaghi, A. A., & Gerami, A. (2005). Biophysical and biochemical characteristics of bactrian camel semen collected by artificial vagina. *Theriogenology*, 63(1), 92-101.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Mozo, R., Alabart, J. L., Rivas, E., Echegoyen, E., Navarro, M. A., & Folch, J. (s.f.). Desarrollo de un dispositivo intravaginal para la recogida de semen en ganado ovino.
- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A., & Peña, A. I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *Rev ITEA*, 101, 175-191.
- Palmer, C. W., Amundson, S. D., Brito, L. F., & Barth, A. D. (2004). Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. *Animal reproduction science*, 80(3), 213-223.
- Palmer, C. W., Brito, L. F., Arteaga, A. A., Söderquist, L., Persson, Y., & Barth, A. D. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal reproduction science*, 87(1), 25-31.
- Parks, J. (s.f.). Processing and handling bull semen for artificial insemination—Don't add insult to injury. *Department of Animal Science Cornell University*.



- Pinto, C. R., Loaiza, R. A., Arias, J. L., Gonzalez, J. L., Villadiego, F. C., & Garay, O. V. (2012). Efecto de los niveles de proteína y energía de la dieta sobre la calidad seminal y los perfiles metabólicos de toros Brahman. *Revista Científica*, 22(2).
- Sánchez Riquelme, A., & Garrido Burgos, D. (2013). Evaluación de una prueba hipoosmótica simplificada en semen canino fresco y refrigerado. *Revista Científica*, 23(006).
- Sesma, B. R., Hernández, H. R., Nazar, P. M., Llaven, M. Á., Miceli, F. A., Martínez, R. I., . . . Trujillo, G. U. (2010). Caracterización reproductiva de toros Bos taurus y Bos indicus y sus cruza en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico Mexicano. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 94-102.
- Sesma, B. R., Hernández, H. R., Nazar, P. M., TíPacamú, G. A., & Velasco, H. L. (s.f.). Comportamiento reproductivo de sementales bovinos de la raza pardo suizo (Bos taurus) activos, en un sistema de monta abierta en la región Central del estado de Chiapas.
- Stelletta, C., Vencato, J., Oztutar, F., Milani, C., Daskin, A., & Romagnoli, S. (2015). Characterization of accessory glands ultrasonography in rams of endangered venetian sheep breeds. *Animal Reproduction*, 12(3), 566-566.
- Thun, R., Hurtado, M., & Janett, F. (2002). Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57(3), 1087-1094.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579-585.

## ANEXOS

**Anexo 1. Prueba de Normalidad de datos de Shapiro Wilk para variables espermáticas Pre congelación**

Pruebas de normalidad				
Método		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Estadístico	gl	Sig.
Concentración	VA	0,102	30	,200*
	EE	0,099	30	,200*
MM	VA	0,259	30	0,000
	EE	0,214	30	0,001
MIP	VA	0,248	30	0,000
	EE	0,156	30	0,059
VE	VA	0,101	30	,200*
	EE	0,179	30	0,015
AT	VA	0,075	30	,200*
	EE	0,172	30	0,024

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

**a. Corrección de significación de Lilliefors**

**Anexo 2. Prueba de Homogeneidad de las varianzas de Levene para variables espermáticas Pre congelación**

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>Concentración</b>	1,634	1	58	0,206
<b>MM</b>	15,953	1	58	0
<b>MIP</b>	0,002	1	58	0,968
<b>VE</b>	0,096	1	58	0,757
<b>AT</b>	0,661	1	58	0,419

## Anexo 3. ANOVA de Variables de calidad espermática precongelación

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Concentración</b>	Entre grupos	1246753,350	1	1246753,350	10,529	0,002
	Dentro de grupos	6868171,900	58	118416,757		
	Total	8114925,250	59			
<b>MM</b>	Entre grupos	18,040	1	18,040	35,486	0,000
	Dentro de grupos	29,486	58	0,508		
	Total	47,526	59			
<b>MIP</b>	Entre grupos	2041,667	1	2041,667	28,250	0,000
	Dentro de grupos	4191,667	58	72,270		
	Total	6233,333	59			
<b>VE</b>	Entre grupos	11,267	1	11,267	0,215	0,645
	Dentro de grupos	3040,667	58	52,425		
	Total	3051,933	59			
<b>AT</b>	Entre grupos	115,371	1	115,371	4,843	0,032
	Dentro de grupos	1381,785	58	23,824		
	Total	1497,156	59			

**Anexo 4. Prueba U de Mann Withney para Motilidad Masal Precongelación**

<b>Estadísticos de prueba<sup>a</sup></b>	
	MM
<b>U de Mann-Whitney</b>	132,000
<b>W de Wilcoxon</b>	597,000
<b>Z</b>	-4,803
<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>	0,000
<b>a. Variable de agrupación: Método</b>	



### Anexo 5. Prueba de Normalidad de datos de Shapiro Wilk para variables espermáticas Posdescongelación

Pruebas de normalidad				
Método		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
		Estadístico	gl	Sig.
<b>MIP</b>	VA	0,131	54	0,022
	EE	0,120	54	0,051
<b>VE</b>	VA	0,096	54	,200*
	EE	0,100	54	,200*
<b>AT</b>	VA	0,109	54	0,160
	EE	0,130	54	0,024
<b>AC</b>	VA	0,152	54	0,003
	EE	0,159	54	0,002
<b>HOSTest</b>	VA	0,180	54	0,000
	EE	0,129	54	0,026

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**Anexo 6. Prueba de Homogeneidad de las varianzas de Levene para variables espermáticas Pos descongelación**

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>MIP</b>	1,744	1	106	0,190
<b>VE</b>	0,641	1	106	0,425
<b>AT</b>	0,001	1	106	0,979
<b>AC</b>	1,212	1	106	0,273
<b>HOSTest</b>	0,705	1	106	0,403

### Anexo 7. ANOVA de variables de calidad espermática posdescongelación

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>MIP</b>	Entre grupos	675,000	1	675,000	2,238	0,138
	Dentro de grupos	31968,519	106	301,590		
	Total	32643,519	107			
<b>VE</b>	Entre grupos	773,343	1	773,343	2,347	0,128
	Dentro de grupos	34921,426	106	329,447		
	Total	35694,769	107			
<b>AT</b>	Entre grupos	154,083	1	154,083	2,961	0,088
	Dentro de grupos	5515,130	106	52,030		
	Total	5669,213	107			
<b>AC</b>	Entre grupos	1180,083	1	1180,083	10,427	0,002
	Dentro de grupos	11996,833	106	113,178		
	Total	13176,917	107			
<b>HOSTest</b>	Entre grupos	602,083	1	602,083	9,625	0,002
	Dentro de grupos	6630,833	106	62,555		
	Total	7232,917	107			

### Anexo 8. Prueba U de Mann Withney para AT y HOS-Test posdecongelación

Estadísticos de prueba <sup>a</sup>			
	AC		HOS-Test
U de Mann-Whitney	926,500	U de Mann-Whitney	872,000
W de Wilcoxon	2411,500	W de Wilcoxon	2357,000
Z	-3,269	Z	-3,606
Sig. asintótica (bilateral)	0,001	Sig. asintótica (bilateral)	0,000
a. Variable de agrupación: Método			

### Anexo 9. Fotografías



COLECTA CON VAGINA ARTIFICIAL



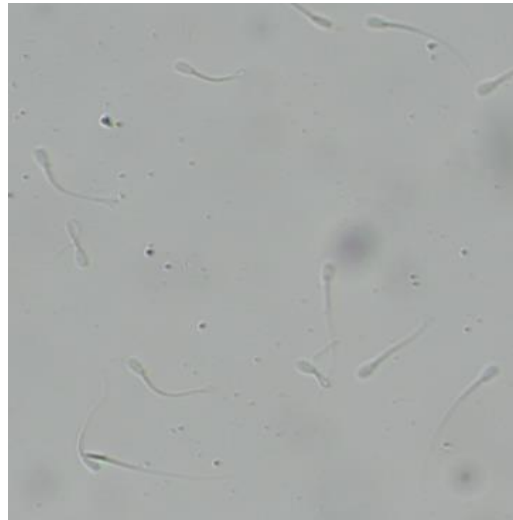
COLECTA CON ELECTROEYACULADOR



ANALISIS SEMINAL CON CAMARA ADAPTADA AL MICROSCOPIO Y VIZUALIZADA EN UN MONITOR



FROTIS EOSINA - NIGROSINA

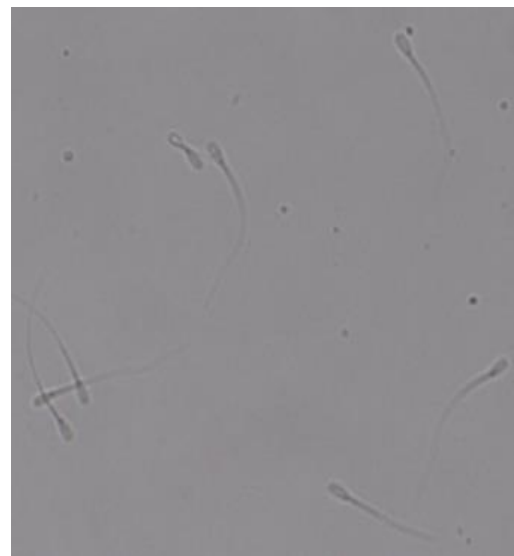


TEST DE HOST

MUESTRAS COLECTADAS CON VAGINA ARTIFICIAL



FROTIS EOSINA - NIGROSINA



TEST DE HOST

MUESTRAS COLECTADAS CON ELECTROEYACULADOR